

10/506631

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

INABA, Yoshiyuki
TMI ASSOCIATES, 8F
37 Mori Building, 5-1, Toranomon 3-chome
Minato-ku, Tokyo 105-0001
JAPON

| | | |
|---|---|---|
| Date of mailing(day/month/year) 18 September 2003 (18.09.03) | | |
| Applicant's or agent's file reference E0006SW02WO | | |
| IMPORTANT NOTICE | | |
| International application No. PCT/JP03/02868 | International filing date(day/month/year) 11 March 2003 (11.03.03) | Priority date(day/month/year) 11 March 2002 (11.03.02) |
| Applicant EISAI CO., LTD. | | |

1. Notice is hereby given that the International Bureau has **communicated**, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this notice:

AU, AZ, BY, CH, CN, CO, DE, DZ, HU, JP, KG, KP, KR, MD, MK, MZ, RU, TM, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE, AG, AL, AM, AP, AT, BA, BB, BG, BR, BZ, CA, CR, CU, CZ, DK, DM, EA, EC, EE, EP, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, ID, IL, IN, IS, KE, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PH, PL, PT, RO, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 18 September 2003 (18.09.03) under No. 03/075935

4. **TIME LIMITS for filing a demand for international preliminary examination and for entry into the national phase**

The applicable time limit for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph**, be **30 MONTHS** from the priority date, not only in respect of any elected Office if a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of **19 months** from the priority date, but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see *PCT Gazette* No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 19926, 19932 and 19934, as well as the *PCT Newsletter*, October and November 2001 and February 2002 issues.

In practice, **time limits other than the 30-month time limit** will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain designated or elected Offices. For **regular updates on the applicable time limits** (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

For filing a **demand for international preliminary examination**, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Chapter IX. Only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

It is the applicant's **sole responsibility** to monitor all these time limits.

| | |
|---|--|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer Judith Zahra |
| Facsimile No.(41-22) 740.14.35 | Telephone No.(41-22) 338.91.11 |

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年9月18日 (18.09.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/075935 A1

(51) 国際特許分類⁷: A61K 31/675, 9/10, 9/14, 9/16, 9/20, 9/48, 31/525, A61P 1/16, 1/18, 9/00, 9/10, 17/02, 29/00, 37/00, 43/00 // C07D 475/14, C07F 9/6561

(74) 代理人: 稲葉 良幸, 外 (INABA, Yoshiyuki et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号37森ビル 8階 TMI総合法律事務所 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/02868

(22) 国際出願日: 2003年3月11日 (11.03.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-65720 ✓ 2002年3月11日 (11.03.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): エーザイ株式会社 (EISAI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒112-8088 東京都文京区小石川4-6-10 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 荒木 誠一 (ARAKI, Seiichi) [JP/JP]; 〒300-0810 茨城県土浦市永国台1-35 Ibaraki (JP). 鈴木 護 (SUZUKI, Mamoru) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県つくば市松代1-30-3 Ibaraki (JP). 児玉 耕太郎 (KODAMA, Kohtarou) [JP/JP]; 〒300-0815 茨城県土浦市中高津2-12-2 Ibaraki (JP). 豊澤 逸生 (TOYOSAWA, Toshio) [JP/JP]; 〒305-0041 茨城県つくば市上広岡527-63 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: DRUGS CONTAINING RIBOFLAVIN-TYPE COMPOUNDS

(54) 発明の名称: リボフラビン系化合物を含む医薬

(57) Abstract: It is intended to provide drugs which contain as the active ingredient at least one member selected from among riboflavin, riboflavin derivatives and pharmacologically acceptable salts thereof and have an effect of inhibiting a cytokine such as IL-1 β , IL-6, IL-10, INF- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-8 or MCP-1; and preventives or remedies for inflammatory diseases accompanied by hypercytokinemia which have an excellent cytokine inhibitory effect.

(57) 要約: リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理学的に許容される塩の少なくとも一つを有効成分とし、IL-1 β 、IL-6、IL-10、INF- γ 、TNF- α 、GM-CSF、IL-8、MCP-1等のサイトカインを抑制する作用を有する医薬を提供する。また、優れたサイトカイン抑制作用を有し、高サイトカイン血症を伴う炎症性疾患の予防又は治療剤を提供する。

WO 03/075935 A1

明細書

リボフラビン系化合物を含む医薬

5 技術分野

本発明は、リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理学的に許容される塩（以下、リボフラビン系化合物ということがある）を有効成分とし、サイトカイン抑制作用を有する医薬に関する。また、本発明は、リボフラビン系化合物を有効成分とし、感染に起因しない全身性炎症反応症候群の予防又は治療に
10 有用な医薬に関する。

関連技術

多くの疾患において炎症反応が関与しており、いわゆる炎症性疾患だけではなく、アルツハイマー痴呆症や心臓疾患等においても炎症反応が重要な影響を持つ
15 ことが分かってきている。

炎症反応が関与する疾患の中でも、とりわけ全身性の炎症兆候を伴う病態である全身性炎症反応症候群は、侵襲を受けた生体の反応を把握するサインとして重要である。また、この全身性炎症反応症候群となっている状態において、症状が進行したり合併症が起こると、成人呼吸促迫症候群（ARDS；adult respiratory distress syndrome）、播種性血管内血液凝固（DIC；disseminated intravascular coagulation）、多臓器不全（MOF；multiple organ failure）等の機能不全（MODS；multiple organ dysfunction syndrome）に陥り、意識障害、呼吸困難、血圧低下等の症状を示し、ショック状態となり死に至る場合もある。この全身性炎症反応症候群を引き起こす原因としては、感染症のほか、外
20 傷、熱傷、肺炎、手術等の様々な侵襲がある。

従来から、全身性炎症反応症候群の病態には、蛋白質性シグナル伝達物質であるサイトカインの過剰誘導が関与していることが知られている。これに関して、全身性炎症反応症候群の進行度とサイトカインの血中濃度との間には一定の相関関係があることが報告されている（小川道雄：新・侵襲とサイトカイン．生体防

5 御と生体破壊という諸刃の剣，メジカルセンス，東京，1999， Bone, R. C. : Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome : What we do and do not know about cytokine regulation. Crit. Care Med. 24 , 163-172, 1996) 。このことから、全身性炎症反応症候群は高サイトカイン血症の一つであるということが出来る。

10

現在まで、高サイトカイン血症の予防又は治療のために、サイトカインの誘導や発現を抑制する試みがなされている。

例えば、副腎皮質ステロイド剤を投与してサイトカインの誘導を抑制する試みがなされている（Luce, J. M. et al. : Ineffectiveness of high-dose methylprednisolone in preventing parenchymal lung injury and improving mortality in patients with septic shock. Am. Rev. Respir. Dis. 138 , 62-68 , 1988) 。

15

また、抗TNF- α 抗体やインターロイキン-1レセプターアンタゴニスト（IL-1RA）等を投与してサイトカインの機能発現を抑制する試みがなされている（Abraham, E. et al : Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor α in patients with sepsis syndrome : A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. J. A. M.A. 273 , 934-941, 1995, Fisher, C. J. et al. : Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome : Results from a randomized, double-blind, placebo-con

20

25

olled trial. J. A. M. A. 271, 1836-1844, 1994, Dhainaut, J-F. A. et al.
: Platelet-activating factor receptor antagonist BN 5021 in the treat-
ment of severe sepsis : A randomized, double-blind, placebo-controlle-
d, multicenter clinical trial. Crit. Care Med. 22, 1720-1728, 1994, Fi-
5 sher, J-C. J. et al.: Treatment of septic shock with the tumor necrosi-
s factor receptor: Fc fusion protein. E. Engl. J. Med. 334, 1697-1702,
1996, Bone, R. C.: Sir Issac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. Crit. Ca-
re Med. 24, 1125-1178, 1996)。

また、特開平11-322601号公報には、N-[2-(2-フタルイミド
10 エトキシ)アセチル]-L-アラニル-D-グルタミン酸を有効成分とするサイ-
トカイン産生反応の制御による抗炎症性薬剤組成物が開示されている。

また、特表平8-506322号公報には、カルボキシル化および/または硫
酸化オリゴ糖を含有する活性TNF- α の生産を阻害するための医薬組成物が開
示されている。

15

発明の開示

しかしながら、上記の高サイトカイン血症の予防又は治療剤では、病態やその
進行情況によっては十分な薬効を期待できない場合があり、より高い薬効を有し
予後の改善効果についても優れた医薬の提供が望まれている。

20 なお、特開平5-201864号公報及び特開平10-29941号公報には
、リボフラビン系化合物が免疫賦活・感染防御剤やトキシシンショック予防治療剤
として有用である旨が開示されているが、これらにおいてはリボフラビン系化合
物とサイトカインとの関係については開示されていない。

したがって、本発明の目的は、高サイトカイン血症の予防又は治療のための優
25 れた医薬を提供することにある。

本発明者らは、鋭意研究の結果、リボフラビン系化合物が優れたサイトカイン抑制作用を有することを見出した。すなわち、リボフラビン系化合物を有効成分とする医薬を投与することにより、サイトカインの誘導や発現を抑制することができ、炎症反応が関与する様々な疾患、特に、過度の侵襲が加わった生体の高サイトカイン血症の治療において、優れた薬効を示すことが分かった。

これは、侵襲により生体内において炎症性サイトカインが誘導又は発現された際に、リボフラビン系化合物がこの炎症性サイトカインの誘導や発現を抑制して、生体の恒常性を保つ働きをすることによるものと考えられる。

このように、リボフラビン系化合物がサイトカイン抑制作用を有することを初めて見出したことにより、本発明では、より薬効に優れた高サイトカイン血症の予防又は治療剤を提供することが可能となった。

すなわち、本発明は、リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理的に許容される塩の少なくとも一つを有効成分とし、サイトカイン抑制作用を有する医薬を提供するものである。

換言すれば、本発明は、リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理的に許容される塩の少なくとも一つを有効成分とする、サイトカイン抑制剤を提供するものである。

「少なくとも一つを有効成分」とは、リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理的に許容される塩のいずれか単独を有効成分としてもよく、あるいはこれらのうち複数を有効成分としてもよい、との意味である。

本発明の医薬は、高サイトカイン血症の予防又は治療に有用である。また、本発明の高サイトカイン血症の予防又は治療方法は、リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理的に許容される塩の少なくとも一つを対象物に有効量投与する、ことを特徴とする。

高サイトカイン血症とは、血中のサイトカイン濃度が高くなる状態を伴う疾患

であり、例えば、アルツハイマー痴呆症、パーキンソン病、キャッスルマン病（Castleman病）、関節リウマチ、多発性筋炎、全身性硬化症、混合性結合組織病、フェルティ症候群、回帰性リウマチ、サルコイドーシス、変形性関節症、多発性硬化症、ベーチェット病、エリテマトーデス、アテローム硬化症、心臓疾患、心房粘液腫、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性大腸炎、痛風、接触性皮膚炎、自己免疫性皮膚炎、乾癬症、肺繊維症、肺気腫、びまん性汎細気管支炎、胸膜炎、糸球体腎炎、急性糸球体腎炎、メサングウム増殖腎炎、ループス腎炎、IgA腎炎、糖尿病性腎症、粥状動脈硬化症、結節性動脈硬化症、脈管炎、気管支喘息、慢性歯肉炎、歯周病、出血性ショック、外傷性ショック、アナフィラキシー等の

10 ショック、火傷、脳腫瘍、悪性腫瘍、多発性骨髄腫、骨粗鬆症、痔、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、アレルギー性皮膚炎等のアレルギー、敗血症、敗血症性ショック、多臓器不全、一酸化炭素中毒、薬物等の中毒、急性放射線障害、くも膜下出血、全身性炎症反応症候群、インシュリン依存性糖尿病、ブドウ膜炎、慢性炎症、血液疾患、白血病、膠原病、筋萎縮性側索硬化症、脳浮腫、てんかん、特発性血小板減少性紫斑病、重症筋無力症、神経痛、ギラン・バレー症候群、ニューロパチー、脊髄損傷、花粉症等の自己免疫疾患、脳梗塞、心筋梗塞等の

15 虚血・再灌流障害、動脈硬化、慢性心不全、心筋炎、光過敏症、蓄膿症、強直性脊椎炎、ウエゲナー肉芽腫症、多発性筋炎・皮膚筋炎、シェーングレン症候群、側頭動脈炎、SAPHO症候群、慢性疲労症候群、全身性若年性突発性関節炎、成人ステイル病、子宮内膜症、子宮蓄膿症、中耳炎、腹膜炎、心内膜炎、急性腎不全、急性肝障害、下痢、白内障が挙げられる。

20

ここでいう敗血症とは、血中のサイトカイン濃度が通常値よりも高くなった状態を伴う敗血症を意味する。敗血症性ショックとは、当該敗血症が進行した結果、心、肺、肝、腎、脾、脳、脊髄等の内臓器のうち1以上の臓器の機能不全が起

25 きた状態、または臓器の機能不全の結果、脱力感、めまい、起立困難、血圧低下

、体温低下、不整脈、心室細動、呼吸困難、体温低下、痙攣、意識混濁、意識不明等の症状を示す状態を意味する。

また、本発明の医薬は、特に、全身性炎症反応症候群の予防又は治療に有用である。

- 5 高サイトカイン血症の一つである全身性炎症反応症候群は、炎症性サイトカインが血中で優位となり炎症反応が起こるSIRS (systemic inflammatory response syndrome) と、抗炎症性サイトカインが血中で優位となり免疫抑制状態となって抗炎症反応（例えば、重症感染症）が起こるCARs (compensatory anti-inflammatory response syndrome) という二つの病態があると考えられている
- 10 。本発明のリボフラビン系化合物を有効成分とする医薬を投与すると、そのサイトカイン抑制作用によって、SIRSの症状を予防又は治療する効果があることが分かった。また、SIRSとCARsとは互いに関連しているため、SIRSを予防又は治療することにより、本発明の医薬が有するサイトカイン抑制作用によって、CARsについても予防又は治療をすることができる。
- 15 本発明の「全身性炎症反応症候群の予防又は治療」とは、上記のSIRSやCARsの症状が進行して引き起こされる成人呼吸促迫症候群（ARDS）、播種性血管内血液凝固（DIC）、多臓器不全（MOF）等の機能不全（MODs）の予防又は治療も含む意味であり、本発明の医薬はSIRSやCARsが進行した病態の予防又は治療にも極めて有用である。
- 20 さらに、本発明者らは鋭意研究の結果、本発明のリボフラビン系化合物を有効成分とする医薬が、感染に起因しない全身性炎症反応症候群の予防又は治療においても顕著な効果を有することを見出した。

「感染に起因しない全身性炎症反応症候群」としては、外傷、熱傷、急性又は慢性の肺炎、アルコール性肝傷害、薬物性肝傷害、肝障害、肝炎、肝硬変、虫垂炎、胃潰瘍、虚血／再灌流障害、I型糖尿病、II型糖尿病、糖尿病の悪化、腹

25

膜透析後の後遺症の予防・治療、又は手術に起因する全身性炎症反応症候群が好適に挙げられる。

前記サイトカイン抑制作用は、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $IL-10$ 、 $INF-\gamma$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $GM-CSF$ 、 $IL-8$ 、又は $MCP-1$ のうちの少なくとも

5 一つを抑制するものであることが好ましい。

本発明にいう「サイトカイン抑制作用」は、サイトカインの一種であるケモカインの抑制作用も含む意味である。ケモカインは、分子量約1万の保存された位置にシステイン残基を保有する、50を越えるサイトカインの総称であり、白血球に対して走化活性を示す。 $IL-1\beta$ (interleukin-1 β ; インターロイキン1
10 β)、 $IL-6$ (interleukin-6)、 $IL-10$ (interleukin-10)、 $INF-\gamma$ (interferon- γ ; インターフェロン γ)、 $TNF-\alpha$ (tumor necrosis factor- α ; 腫瘍壊死因子)、 $GM-CSF$ (granulocyte macrophage-colony stimulating factor) はサイトカイン、 $IL-8$ (interleukin-8)、 $MCP-1$ (macrophage chemoattractant protein-1) はケモカイン (サイトカインの一種) である。
15

また、本発明は、リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理学的に許容される塩の少なくとも一つを有効成分とする、感染に起因しない全身性炎症反応症候群の予防又は治療に用いられる医薬を提供する。

「感染に起因しない全身性炎症反応症候群」としては、外傷、熱傷、肺炎、肝
20 障害、虚血／再灌流障害、又は手術に起因する全身性炎症反応症候群が好適に挙げられる。

上記において、前記リボフラビン誘導体又はその薬理学的に許容される塩は、フラビンモノヌクレオチド、フラビンアデニンジヌクレオチド、リボフラビンテトラブチレイト、リン酸リボフラビンナトリウム、リン酸リボフラビンのモノジ
25 エタノールアミン塩、ロイコフラビン、モノハイドロフラビン、ロイコフラビン

リン酸エステル、ロイコフラビンモノヌクレオチド、ロイコフラビンアデニンジヌクレオチド、又はこれらの薬理学的に許容される塩であることが好ましい。

前記サイトカイン抑制作用は、活性酸素の消去作用を機序の一つとするものであってもよい。換言すれば、上記のリボフラビン系化合物投与による前記サイトカイン抑制作用は、活性酸素による組織の機能障害を防御する作用、すなわち活性酸素の消去作用を機序の一つとするものであってもよい。

本発明に係る医薬を投与する対象物は、ヒトまたは動物である。本発明の医薬は特にヒトにおける予防又は治療に有用である。

本発明において動物とは産業動物、伴侶動物および実験動物を指す。産業動物とはウシ、ウマ、ブタ、ヤギ、ヒツジ等の家畜、ニワトリ、アヒル、ウズラ、七面鳥、ダチョウ等の家禽、ブリ、ハマチ、マダイ、マアジ、コイ、ニジマス、ウナギ等の魚類など産業上飼養することが必要とされている動物である。また、伴侶動物とはイヌ、ネコ、マーモセット、小鳥、ハムスター、金魚などのいわゆる愛玩動物、コンパニオン・アニマルを指し、実験動物とはラット、モルモット、ビーグル犬、ミニブタ、アカゲザル、カニクイザルなど医学、生物学、農学、薬学等の分野で研究に供用される動物を示す。

本発明に係る医薬の投与形態としては、特に限定されず病態やその進行状況、その他の条件によって異なるが、前記リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理学的に許容される塩の少なくとも一つを、注射剤、錠剤、顆粒剤、散剤、細粒剤、カプセル剤、丸剤、又は経口液剤（シロップ剤を含む）の形で含有することが好ましい。サイトカイン抑制作用のさらなる向上の観点からは、注射剤により投与することが好ましい。

注射剤の形で投与する場合には、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、皮内、関節内、滑液嚢内、胞膜内、骨膜内等に投与することが好ましく、特に静脈内投与又は腹腔内投与が好ましい。静脈内投与は、点滴投与、ボーラス投与 (bolus) のい

ずれであってもよい。

投与量（有効成分量）は、特に限定されず病態やその進行状況、その他の条件（投与する対象の種類、症状、年齢、体重、性別、合併症、投与時間、投与方法、剤型、感受性差等）によって異なるが、注射剤を静脈内に点滴投与する場合には、0.001～10 mg/kg/hにて、数分～1週間投与することが好ましい。静脈内にボラス投与する場合には、0.1～50 mg/kg、好ましくは0.3～20 mg/kgであり、さらに好ましくは2～20 mg/kgである。腹腔内投与する場合には0.1～50 mg/kg、好ましくは0.3～20 mg/kgであり、さらに好ましくは2～20 mg/kgである。筋肉内投与する場合には0.1～50 mg/kg、好ましくは2～20 mg/kgである。経口投与する場合には1～1000 mg/kg、好ましくは10～500 mg/kg、さらに好ましくは30～200 mg/kgである。

本発明に係る医薬は、そのまま投与してもよく、また通常用いられる製剤添加剤を加えて、公知の方法により注射剤（静脈内投与用（点滴用、ボラス投与用）、腹腔内投与用、筋肉内投与用、皮下投与用等）、経口剤（錠剤、顆粒剤、散在、細粒剤、カプセル剤、丸剤、経口服液剤、シロップ剤等）、経皮吸収製剤、点眼剤、点鼻剤、坐剤、吸入剤（エアゾール剤、粉末状吸入剤、液状吸入剤等）、外用剤（軟膏剤、クリーム剤、液剤等）とすることができる。また、食品や飼料、飲水等に混合することもできる

注射剤を製造する場合には、リボフラビン系化合物に、必要に応じて、溶解補助剤、pH調整剤、緩衝剤、懸濁化剤、抗酸化剤、保存剤、等張化剤などを添加し、常法により製造することができる。溶解補助剤等を輸液として点滴剤を構成してもよく、あるいはこれらに薬理学的に許容される改変を加えたものを輸液として点滴剤を構成してもよい。これらの注射剤は静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下等に投与することができる。あるいは、凍結乾燥して、用時溶解型の凍結乾燥製剤としてもよい。

経口用固形製剤を製造する場合には、リボフラビン系化合物に、必要に応じて、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味矯臭剤、抗酸化剤、溶解補助剤、安定化剤などを添加し、常法により錠剤、被覆錠剤、顆粒剤、散剤、細粒剤、カプセル剤（硬カプセル剤、軟カプセル剤）、丸剤等に行うことができる。

- 5 溶解補助剤としては、特に限定されないが、例えば、生理食塩水、リン酸緩衝生理的食塩水、乳酸化リンゲル溶液、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリソルベート 80、ニコチン酸アミド、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、マクロゴール、ヒマシ油脂肪酸エチルエステル等が挙げられる。

- 10 pH調整剤や緩衝剤としては、特に限定されないが、例えば、有機酸又は無機酸及び／又はその塩や、水酸化ナトリウム、メグルミン等が挙げられる。

懸濁化剤としては、特に限定されないが、例えば、メチルセルロース、ポリソルベート 80、ヒドロキシエチルセルロース、アラビアゴム、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、トラガント末等が挙げられる。

- 15 抗酸化剤としては、特に限定されないが、例えば、アスコルビン酸、 α -トコフェロール、エトキシキン、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール等が挙げられる。

- 20 保存剤としては、特に限定されないが、例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、ソルビン酸、フェノール、クレゾール、クロロクレゾール等が挙げられる。

等張化剤としては、特に限定されないが、例えば、塩化ナトリウム等が挙げられる。

- 25 賦形剤としては、特に限定されないが、例えば、デンプン、コーンスターチ、デキストリン、ブドウ糖、乳糖、白糖、糖アルコール（マンニトール、エリスリトール、キシリトール等）、硬化油、結晶セルロース、無水珪酸、珪酸カルシウム

ム、第二リン酸水素カルシウム等が挙げられる。

結合剤としては、特に限定されないが、例えば、ポリビニルピロリドン、エチルセルロース、メチルセルロース、 α 化デンプン、アラビアゴム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、プロピレングリコール、ポリ
5 リアクリル酸ナトリウム、ポリビニルアルコール等が挙げられる。

崩壊剤としては、特に限定されないが、例えば、クロスポビドン、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、架橋型カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロース、炭酸カルシウム、カルボキシメチルセルロースカル
10 シウム等が挙げられる。

滑沢剤としては、特に限定されないが、例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ステアリン酸カルシウム、フマル酸ステアリルナトリウム、ポリエチレングリコール6000等が挙げられる。

錠剤、顆粒剤、散剤の場合には必要に応じてヒドロキシプロピルメチルセルロース等の皮膜コーティングを施しても良い。
15

経口液剤を製造する場合には、リボフラビン系化合物に、必要に応じて、着色剤、矯味矯臭剤、抗酸化剤、溶解補助剤、安定化剤などを添加し、常法により製造することができる。

また、本発明は、高サイトカイン血症の予防剤又は治療剤を製造するための、
20 リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理学的に許容される塩の少なくとも一つの使用を提供するものである。換言すれば、本発明は、リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理学的に許容される塩の少なくとも一つの使用による高サイトカイン血症の予防剤又は治療剤の製造方法を提供するものである。

25 また、本発明は、高サイトカイン血症の予防剤又は治療剤としての、リボフラ

ビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理学的に許容される塩の少なくとも一つの使用を提供するものである。

また、本発明は、リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理学的に許容される塩の少なくとも一つを対象物（例えば、動物）に投与することを特徴とするサイトカイン抑制を行う必要のある疾患（例えば、炎症性疾患、高サイトカイン血症、全身性炎症反応症候群）の治療方法を提供するものである。

図面の簡単な説明

図 1 は、L P S 投与後における血漿中 I L - 1 β 濃度の経時変化を示すグラフである。

図 2 は、L P S 投与後における血漿中 I N F - γ 濃度の経時変化を示すグラフである。

図 3 は、L P S 投与後における血漿中 I L - 6 濃度の経時変化を示すグラフである。

図 4 は、L P S 投与後における血漿中 G M - C S F 濃度の経時変化を示すグラフである。

図 5 は、L P S 投与後における血漿中 I L - 1 0 濃度の経時変化を示すグラフである。

図 6 は、L P S 投与後における血漿中 T N F - α 濃度の経時変化を示すグラフである。

図 7 は、L P S 投与後における血漿中 M C P - 1 濃度の経時変化を示すグラフである。

図 8 は、L P S 投与後における血漿中 M I P - 2 濃度の経時変化を示すグラフである。

図 9 は、L P S 投与後における血漿中 N O 濃度の経時変化を示すグラフである

。 図10は、SEB投与後における血漿中INF- γ 濃度の経時変化を示すグラフである。

図11は、SEB投与後における血漿中MIP-2濃度の経時変化を示すグラフである。

図12は、SEB投与後における血漿中IL-6濃度の経時変化を示すグラフである。

図13は、TNF- α 投与後におけるIL-6濃度を示すグラフである。

図14は、高濃度ブドウ糖負荷によって産生する活性酸素量を示すグラフである。

図15は、高濃度ブドウ糖負荷によって誘発されるIL-8濃度を示すグラフである。

実施例

15 次に、実施例を示して本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

〔実験で用いた材料〕

5' - リボフラビンナトリウムリン酸エステル（リン酸リボフラビンナトリウム）は、日本薬局方品のリボフラビンナトリウムリン酸エステル（5' - FMN - Na）を合成し、これを生理食塩水（Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan）に溶解（3 mg/mL）したものをを用いた。

LPS（Lipopolysaccharide：リポポリサッカライド）は、大腸菌（*Escherichia coli*）血清型O111：B4由来リポポリサッカライドをシグマ社（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA）から購入し、これを生理食塩水に溶解したものをを用いた。

ELISA (Enzyme linked-immuno-sorbent assay) キットとしては、IL-1 β 、IL-6、IL-10、INF- γ 、TNF- α 、GM-CSF、MCP-1、の各濃度の測定にはバイオソースインターナショナル社 (Biosource International Inc., Camarillo, CA, USA) から購入したキットを用いた。MIP-2濃度の測定にはテクネ社 (TECHNE Corporation, Minneapolis, MN, USA) から購入したキットを用いた。なお、MIP-2は、マウスのケモカインであり、好中球の走化因子である。ヒトではIL-8に相当する。

NO₂/NO₃アッセイキットは、同仁化学研究所 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) から購入したものを用いた。

10 SEB (黄色ブドウ球菌毒素) は、スタフィロコッカス・アウレウス・エンテロトキシン (Staphylococcus aureus enterotoxin) B, BT-202を用いた。

TNF- α は、ペプロテック社 (Pepro Tech, Inc., Rock Hill NJ, USA) からヒトTNF- α K051を購入し、これを生理食塩水 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) に溶解 (15 μ g/mL) したものを用いた。

15 D-ガラクトサミン (D-galactosamine) は、和光純薬工業株式会社 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) から塩酸D-ガラクトサミンを購入し、これを生理食塩水 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) に90 mg/mLにて溶解したものを用いた。

20 AAPH (2,2'-アゾビス (2-アミジノプロパン) ジハイドロクロライド; 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride) は、和光純薬工業株式会社から購入し、これを生理食塩水に溶解 (18.75 mg/mL) したものを用いた。AAPHはフリーラジカル開始剤であり、熱分解によってフリーラジカルを発生する水溶性のアゾ化合物である。

25 [実施例1：エンドトキシン誘発ショックマウスモデルに対する効果] .

雄 I C R マウスは、5 週齢のものを Japan SLC Inc. (Shizuoka, Japan) から購入し、23℃（許容範囲：20～26℃）、相対湿度 55%（許容範囲：40～70%）の条件下で、12 時間毎の明暗サイクル（午前 7 時にライトオンし、午後 7 時にライトオフする）において収容したものを用いた。この際、マウスは、

5 滅菌水道水や通常のえさ（MF, Oriental Yeast Co. Ltd., Tokyo, Japan）にアクセス自由な状態で収容した。この環境に 1 週間順応させた後、実験に供した。

まず、L P S 12mg/kg を雄 I C R マウス（6 週齢）に静脈内投与して、エンドトキシン誘発ショックマウスを作成した。

コントロールグループにおいては、L P S の投与時（0 時間）から、1 時間、
10 3 時間、6 時間、9 時間、12 時間、15 時間、18 時間、21 時間、及び 24 時間経過後にそれぞれ採血を行った。5' -FMN-Na 投与グループにおいては、L P S の投与時から 6 時間経過後に、20mg/kg の 5' -FMN-Na を静脈内に 1 回注入により投与して、L P S の投与時から 9 時間、12 時間、15 時間、18 時間、21 時間、及び 24 時間経過後にそれぞれ採血を行った。い
15 ずれの採血ポイントにおいても各グループ 5 例で構成した。実験の途中で死亡した個体はデータとして使用しなかった。採血には E D T A (ethylene diamine tetraacetic acid) を含むプラスチック製注射器を用い、腹部の静脈から採取した。採取した各血液を遠心分離機（3000rpm、10 分、4℃）にかけ血漿を分離した後、-80℃にて保存した。

20 次に、採取した各血漿中のサイトカイン濃度、ケモカイン濃度、及び NO（一酸化窒素）濃度を測定した。

血漿中のサイトカイン濃度及びケモカイン濃度は、上記 E L I S A キットを用いて E L I S A 法により測定した。プレートリーダー（Spectra max 250, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA）により 450nm にてプレートを読み取り、得られたデータを SOFT max PRO 1.1 (Molecular Devices Corporation
25

, Sunnyvale, CA)を用いて分析した。

上記測定においては、測定限界は、MIP-2については1.5 pg/mL以下、IL-6については3.0 pg/mL以下、IL-1 β については7.0 pg/mL以下、INF- γ については1.0 pg/mL以下、TNF- α については3.0 pg/mL以下、MCP-1については9.0 pg/mL以下、IL-10については0.9 pg/mL以下、GM-CSFについては1.0 pg/mL以下、とし、測定限界以下の値については0 pg/mLとした。

血漿中のNO濃度は、NO₂/NO₃アッセイキットを用い、NO₂とNO₃の合計量を検出することにより測定した。各血漿は、それぞれマイクロコンセンレータ (Amicon: Beverly, MA, USA) によって濾過した後、遠心分離機 (15000 rpm、15分、4℃) にかけた。遠心分離機にかけた血漿サンプルに、NO₃還元酵素を添加し、NO₃をNO₂に転換させ、グリス試薬 (Gress reagent) を用いて総NO₂量を測定した。プレートリーダー (Spectra max 250) により540 nmにてプレートを読み取り、得られたデータについて上記SOFT max PRO 1.1を用いて分析した。

コントロールグループと5'-FMN-Na投与グループとの差異を対応のないt検定により分析した。統計学的分析は、SAS 6.12 (SAS Institute Japan Inc., Tokyo, Japan) を用いて行い、P値が0.05 (two-sided) より小さい場合に統計学的に有意であると判断した。

上記のようにして測定したサイトカイン濃度の測定結果を図1～図6に、ケモカイン濃度の測定結果を図7及び図8に、NO濃度の測定結果を図9に示す。

なお、図1～9においては、各プロットは平均値±標準誤差で示した。白抜きされたプロットはコントロールグループを示し、白抜きされていないプロットは5'-FMN-Na投与グループを示す。

図1に示すように、血漿中のIL-1 β 濃度は、LPSの投与時から9時間経

過後にピークを示し、その後徐々に減少した。一方、5' - FMN - Na 投与グループ (LPS 投与時から6時間経過後に5' - FMN - Na を投与) においては、5' - FMN - Na 投与直後から IL - 1 β 濃度が減少し初め、LPS 投与から9時間～12時間経過の間において IL - 1 β 濃度がすみやかに低減した。

- 5 図2に示すように、血漿中の INF - γ 濃度は、LPS の投与時から6時間経過後にピークを示し、その後徐々に減少した。一方、5' - FMN - Na 投与グループにおいては、9時間～18時間経過の間において INF - γ 濃度がすみやかに低減した。

- 10 図3に示すように、血漿中の IL - 6 濃度は、LPS の投与後急増し1時間経過後にピークを示した後、徐々に減少した。コントロールグループにおいては、IL - 6 濃度はLPS 投与時から24時間経過後においても依然として高い値を示した。5' - FMN - Na 投与グループにおいては、6時間経過後に5' - FMN - Na を投与したことにより、IL - 6 濃度がすみやかに減少し、その状態が21時間経過後まで維持された。

- 15 図4に示すように、血漿中の GM - CSF 濃度は、1時間～6時間経過の間においてピークを示し、9時間経過後までにはもとの値まで減少した。その後、LPS 投与時から21時間経過後において、2回目のピークが観察された。一方、5' - FMN - Na 投与グループにおいては、6時間経過後に5' - FMN - Na を投与したことにより、LPS 投与時から21時間経過後において GM - CSF 濃度を減少させる傾向が認められた。
- 20

図5及び図6に示すように、血漿中の IL - 10 濃度と TNF - α 濃度は、LPS 投与時から1時間経過後と21時間経過後においてそれぞれ明確な2つのピークを示した。5' - FMN - Na を投与したことにより、2回目のピーク時において IL - 10 濃度及び TNF - α 濃度が減少した。

- 25 図7に示すように、血漿中の MCP - 1 濃度は、LPS 投与後に急増し6時間

経過時にピークを示した。その後、MCP-1濃度は徐々に低減した。5'-FMN-Naを投与したことにより、MCP-1濃度は減少され、この状態が21時間経過後まで維持された。

図8に示すように、血漿中のMIP-2濃度は、LPS投与後に急増し1時間
5 ～3時間経過の間においてピークを示した後減少した。その後、コントロールグループにおいては21時間経過後において2回目のピークが観察されたが、5'-FMN-Na投与グループにおいては9時間経過後にMIP-2濃度が減少し、この状態が21時間経過後まで維持された。

図9に示すように、NO濃度はLPS投与後急増し9時間経過後にピークを示
10 した。この高いNO値は24時間経過後まで続いた。NO値の増加はサイトカインの誘導に関係していると考えられる。5'-FMN-Naは9時間～18時間経過の間においてNO値の抑制効果を示さなかったが、21時間～24時間経過の間においてはNO値の抑制効果を示した。

以上のように、5'-FMN-Naはエンドトキシンによって誘発された血中
15 サイトカイン、ケモカイン、及びNOの濃度上昇を抑制する作用があることが分かった。

〔実施例2：エキソトキシン誘発ショックマウスモデルに対する効果〕

雄BALB/cマウスは、5週齢のものを日本チャールスリバーから購入し、
20 前記雄ICRマウスと同様の条件で1週間順応させたものを、実験に供した。

まず、SEB 0.75mg/kg及びD-ガラクトサミン1.8g/kgを、雄BALB/cマウス（6週齢）に腹腔内投与して、エキソトキシン（SEB）誘発ショックマウスを作成した。

コントロールグループにおいては、SEBの投与時（0時間）から、6時間、
25 9時間、12時間、15時間、及び18時間経過後にそれぞれ採血を行った。5

5' - FMN - Na 投与グループにおいては、SEBの投与時から6時間経過後に、20 mg / kg の 5' - FMN - Na を静脈内に1回注入により投与して、SEBの投与時から9時間、12時間、15時間、及び18時間経過後にそれぞれ採血を行った。いずれの採血ポイントにおいても各グループ5例で構成した。実験の途中で死亡した個体はデータとして使用しなかった。採血にはEDTAを含むプラスチック製注射器を用い、腹部の静脈から採取した。採取した各血液を遠心分離機（3000 rpm、10分、4℃）にかけ血漿を分離した後、-80℃にて保存した。

次に、採取した各血漿中のサイトカイン濃度及びケモカイン濃度を実施例1と同様にして測定・分析・プロットした。得られたサイトカイン濃度及びケモカイン濃度の測定結果を図10～図12に示す。

図10に示すように、血漿中のINF- γ 濃度は、SEBの投与時から9時間経過後にピークを示し、その後減少した。一方、6時間経過後に5' - FMN - Na を投与したところ、12時間経過付近においてINF- γ 濃度の抑制効果が認められた。

図11に示すように、血漿中のMIP-2濃度は、SEBの投与時から12時間経過後にピークを示し、その後減少した。SEB投与から6時間経過後に5' - FMN - Na を投与したところ、12時間経過付近においてMIP-2の抑制効果が認められた。

図12に示すように、IL-6濃度はSEBの投与時から12時間経過後にピークを示した。SEB投与から6時間経過後に5' - FMN - Na を投与したところ、9時間～12時間経過付近においてIL-6濃度の抑制傾向が認められた。

以上のように、5' - FMN - Na はエキソトキシンによって誘発された血中サイトカイン及びケモカインの濃度上昇を抑制する作用があることが分かった。

〔実施例 3 : TNF- α 誘発ショックマウスモデルに対する効果〕

雌の I C R マウスは、4 週齢のものを Japan CRJ Inc. (Kanagawa, Japan) から購入した。雄の B A L B / c マウスは、5 週齢のものを Japan SLC Inc. (Shizuoka, Japan) から購入した。これらのマウスをそれぞれ、23℃ (許容範囲 : 20~26℃)、相対湿度 55% (許容範囲 : 40~70%) の条件下で、12 時間毎の明暗サイクル (午前 7 時にライトオンし、午後 7 時にライトオフする) において収容した。この際、マウスは、滅菌水道水や通常のえさ (MF, Oriental Yeast Co. Ltd., Tokyo, Japan) にアクセス自由な状態で収容した。この環境に 1 週間順応させた後、実験に供した。

まず、3 μ g のヒト TNF- α と 18 mg の D-ガラクトサミン (0.2 mL / 体重 30 g) を、一群各 10 例の雌 I C R マウス (5 週齢) に腹腔内注入した。TNF- α 及び D-ガラクトサミンを投与した直後に、マウスに 20 mg / kg の 5'-FMN-Na (5'-FMN-Na 投与グループ) 又は生理食塩水 (コントロールグループ) を静脈内注入した。TNF- α を注入してから 7 日間経過後におけるマウスの生存率 (%) を観察した。その結果を表 1 に示す。

なお、実施例 3 においても、スチールテスト (Steel test) によって分析した。統計学的分析は、実施例 1 と同様の SAS 6.12 を用いて行い、P 値が 0.05 (two-sided) より小さい場合に統計学的に有意であると判断した。

〔表 1〕

| 試験群 | 生存数 | 生存率 (%) |
|-------------------|--------|---------|
| 生理食塩水 | 2 / 10 | 20 |
| 5'-FMN-Na 20mg/kg | 7 / 10 | 70 |

表1に示すように、コントロールグループの生存率は20%であったのに対して、5'-FMN-Na投与グループの生存率は70%であった。なお、コントロールグループのマウスは8匹とも3日以内に死亡した。

次に、3 μ gのヒトTNF- α と18mgのD-ガラクトサミン(0.2mL/体重30g)を、一群各10例の雄BALB/cマウス(6週齢)に腹腔内注入した。TNF- α 及びD-ガラクトサミンを投与した直後に、マウスに20mg/kgの5'-FMN-Na(5'-FMN-Na投与グループ)又は生理食塩水(コントロールグループ)を静脈内注入した。TNF- α を注入してから7日間経過後におけるマウスの生存率(%)を観察した。その結果を表2に示す。

10 [表2]

| 試験群 | 生存数 | 生存率(%) |
|-------------------|------|--------|
| 生理食塩水 | 1/10 | 10 |
| 5'-FMN-Na 20mg/kg | 6/10 | 60 * |

* P<0.05 vs. Saline (Steel test)

表2に示すように、コントロールグループの生存率は10%であったのに対して、5'-FMN-Na投与グループの生存率は60%であった。なお、コントロールグループのマウスは9匹とも3日以内に死亡した。

以上の結果から、5'-FMN-Naを投与することによりTNF- α 誘発ショックに対する生存率を著しく増加させることが分かった。すなわち、5'-FMN-Naを投与することにより、トキシン誘発ショックだけでなく、TNF- α 誘発ショックに対する生存率を著しく増加させることが分かった。

20 次に、TNF- α 誘発マウス腹腔マクロファージからのIL-6産生に対する5'-FMN-Naの添加による効果を検討した。雄のICRマウスをエーテル麻酔下にて頸動脈から放血させて死亡させ、4.5mL/マウスのハンクス液(HBSS: Gibco, Laboratories Grand Island, NY, USA)を腹腔内注入した後

、腹腔液を採取した。採取した腹腔液を、冷却したHBSSとともに、遠心分離機（1000rpm、10分）にかけて、腹腔マクロファージを分離した。

これらの細胞は、15%の不活性化マウス血清を添加したイーグル培養液（Eagles minimal essential medium; Nissui Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan）に 1×10^6 細胞/mLで懸濁させ、37℃で5%のCO₂存在下にて、Lab-Tekチャンバー（Nalgen Nunc International, Naperville, IL, USA）内で培養させた。マウス腹腔マクロファージに、1.56 μ g/mL又は25 μ g/mLの5'-FMN-Na存在下で、あるいは5'-FMN-Naの非存在下で、10 ng/mLのTNF- α を反応させ、24時間培養した。

10 IL-6の測定には、上記ELISAキットを用いた。測定した結果を図13に示す。

図13に示すように、TNF- α が10 ng/mL添加されたマウス腹腔マクロファージでは、IL-6のレベルが上がった。一方、5'-FMN-Naが1.56 μ g/mL又は25 μ g/mLがさらに添加されたマウス腹腔マクロファージでは、誘導されたIL-6が抑制されることが分かった。

〔実施例4：AAPH中毒マウスモデルに対する効果〕

実施例4においては、実施例1と同様のものを購入し、同様の条件で順応させた雄ICRマウスを用いた。

20 一群各10例の雄ICRマウス（6週齢）に、125 mg/kgのAAPH（0.2 mL/体重30 g）を腹腔内注入した。AAPHの注入から24時間前、注入直後、1時間後、の各時において、マウスに20 mg/kgの5'-FMN-Na（5'-FMN-Na投与グループ）又は生理食塩水（コントロールグループ）を静脈内注入した。AAPHを注入してから7日間経過後におけるマウス
25 の生存率（%）を観察した。その結果を表3に示す。

なお、実施例 4 においては、5' - FMN - Na 投与グループ及びコントロールグループ間の差異はスチールテスト (Steel test) によって分析した。統計学的分析は、実施例 1 と同様の SAS 6.12 を用いて行い、P 値が 0.05 (two-sided) より小さい場合に統計学的に有意であると判断した。

5 [表 3]

| 試験群 | 生存数 | 生存率 (%) |
|---|--------|---------|
| 生理食塩水 | 2 / 10 | 20 |
| 5'-FMN-Na 20mg/kg i. v. (-24h, 0, +1h) | 6 / 10 | 60 |

表 3 に示すように、コントロールグループの生存率は 20% であったのに対して、5' - FMN - Na 投与グループの生存率は 60% であった。なお、コントロールグループのマウスは 8 匹とも 2 日以内に死亡した。

次に、AAPH 注入から 24 時間前、注入直後、の各場合において、5' - FMN - Na 又は生理食塩水を、静脈内注入に代えて腹腔内注入した以外は上記と同様にして、AAPH を注入してから 7 日間経過後におけるマウスの生存率 (%) を観察した結果を表 4 に示す。

15 [表 4]

| 試験群 | 生存数 | 生存率 (%) |
|--------------------------------------|--------|---------|
| 生理食塩水 | 1 / 10 | 10 |
| 5'-FMN-Na 20mg/kg i. p. (-24h, 0) | 7 / 10 | 70 * |

* P<0.05 vs. Saline (Steel test)

表 4 に示すように、コントロールグループの生存率は 10% であったのに対して、5' - FMN - Na 投与グループの生存率は 70% であった。なお、コントロールグループのマウスは 9 匹とも 3 日以内に死亡した。

以上の結果から、5'-FMN-Naを投与することにより、AAPH中毒に対する生存率を著しく増加させることが分かった。すなわち、AAPHはフリーラジカル開始剤であることから、5'-FMN-Naを投与することにより活性酸素による組織の機能障害を防御する効果が得られることが分かった。

- 5 また、TNF- α が細胞膜受容体や細胞片の損傷部における活性酸素を増加させる作用があることが知られている (Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS and Schumacker PT: Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. J Immunol 15, 1013-1021 (2000)) ことから、5'-FMN-Na投与によるTNF- α 抑制
10 作用は、5'-FMN-Na投与による活性酸素の消去作用を機序の一つとして
 いることが分かった。

[実施例5：ブドウ糖高負荷時の内皮細胞の活性酸素産生に対する効果]

- プラスチックシャーレ上に培養したヒト血管内皮細胞 (HUVEC細胞) に、
15 5'-FMN-Na濃度がそれぞれ6.25 μ g/mL、1.56 μ g/mL、0.
 39 μ g/mL、0.1 μ g/mLとなるように5'-FMN-Naを添加した
 後、CO₂インキュベータで37℃にて、3時間培養した。次に、各シャーレに
 おけるブドウ糖濃度が30 mMになるようにブドウ糖 (グルコース) を添加した
 後、CO₂インキュベータで37℃にて、1時間培養した。培養終了後、細胞を
20 集め、BURSTTEST (細胞内活性酸素測定キット; ORPEGEN Pharma) を用いて、細
 胞内活性酸素量をFACS Calibur (フローサイトメトリーシステム; 日本ベクトン
 ・ディッキンソン) にて測定した。具体的には、FACS Caliburを用いFL1の平
 均蛍光強度から細胞10000個の活性酸素量を測定した。その結果を図14に
 示す。

- 25 図14に示すように、コントロールグループの蛍光強度 (平均蛍光値) は91

2であったが、30 mMのブドウ糖を負荷すると活性酸素が産生し、蛍光強度は140.5に上昇した。一方、6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の5'-FMN-Naを添加すると蛍光強度は89.5に低下し、活性酸素の産生を抑制した。さらに、1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の添加では蛍光強度は111.9であり、0.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の添加では蛍光強度は125.0であり、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の添加では蛍光強度は114.2であった。

以上の結果から、5'-FMN-Naを添加することにより、高濃度のブドウ糖負荷による活性酸素産生を抑制することが示された。

さらに、シャーレ上に培養したHUV EC細胞に、5'-FMN-Na濃度がそれぞれ25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように5'-FMN-Naを添加した後、CO₂インキュベータで37℃にて、3時間培養した。次に、各シャーレにおけるブドウ糖濃度が30 mMとなるようにブドウ糖を添加した後、CO₂インキュベータで37℃にて、2時間培養した。培養終了後、培養液中のIL-8をELISAキットで測定した。その結果を図15に示す。

図15に示すように、コントロールグループにおいては、30 mMのブドウ糖を負荷するとIL-8を産生し、培地中のIL-8濃度は1196 pg/mLに上昇した。一方、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の5'-FMN-Naを添加すると培地中のIL-8濃度は168に低下し、6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を添加すると培地中のIL-8濃度は297 pg/mLに低下し、IL-8の産生を有意に抑制した (Dunnett検定)。

以上の結果から、5'-FMN-Naの添加により高濃度のブドウ糖負荷によるIL-8産生を抑制することが示された。実施例5の結果から、5'-FMN-Naを有効成分とする剤が、糖尿病や糖尿病による悪化病態に対する治療・予防剤として作用することが示唆された。

本発明の医薬は、優れたサイトカイン抑制作用を有し、高サイトカイン血症を伴う炎症性疾患の予防又は治療剤等として有用である。

請求の範囲

1. リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理学的に許容される塩の少なくとも一つを有効成分とし、サイトカイン抑制作用を有する医薬。

5

2. 高サイトカイン血症の予防又は治療に用いられる請求項 1 記載の医薬。

3. 全身性炎症反応症候群の予防又は治療に用いられる請求項 1 記載の医薬。

10 4. 前記全身性炎症反応症候群は、感染に起因しないものである請求項 3 記載の医薬。

5. 前記全身性炎症反応症候群は、外傷、熱傷、肺炎、肝障害、虚血／再灌流障害、又は手術に起因するものである請求項 4 記載の医薬。

15

6. 前記サイトカイン抑制作用は、IL-1 β 、IL-6、IL-10、INF- γ 、TNF- α 、GM-CSF、IL-8、又はMCP-1のうちの少なくとも一つを抑制するものである請求項 1～5 のいずれか一項に記載の医薬。

20 7. リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理学的に許容される塩の少なくとも一つを有効成分とする、感染に起因しない全身性炎症反応症候群の予防又は治療に用いられる医薬。

25 8. 前記全身性炎症反応症候群は、外傷、熱傷、肺炎、肝障害、虚血／再灌流障害、又は手術に起因する請求項 7 記載の医薬。

9. 前記リボフラビン誘導体又はその薬理学的に許容される塩は、フラビンモノヌクレオチド、フラビンアデニンジヌクレオチド、リボフラビンテトラブチレイト、リン酸リボフラビンナトリウム、リン酸リボフラビンのモノジエタノールアミン塩、ロイコフラビン、モノヒドロフラビン、ロイコフラビンリン酸エステル、ロイコフラビンモノヌクレオチド、ロイコフラビンアデニンジヌクレオチド、又はこれらの薬理学的に許容される塩である請求項1記載の医薬。

10. 前記リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理学的に許容される塩の少なくとも一つを、注射剤、錠剤、顆粒剤、散剤、細粒剤、カプセル剤、丸剤、又は経口液剤の形で含有する請求項1記載の医薬。

11. 前記サイトカイン抑制作用は、活性酸素の消去作用を機序の一つとする請求項1記載の医薬。

15

12. 高サイトカイン血症の予防剤又は治療剤を製造するための、リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理学的に許容される塩の少なくとも一つの使用。

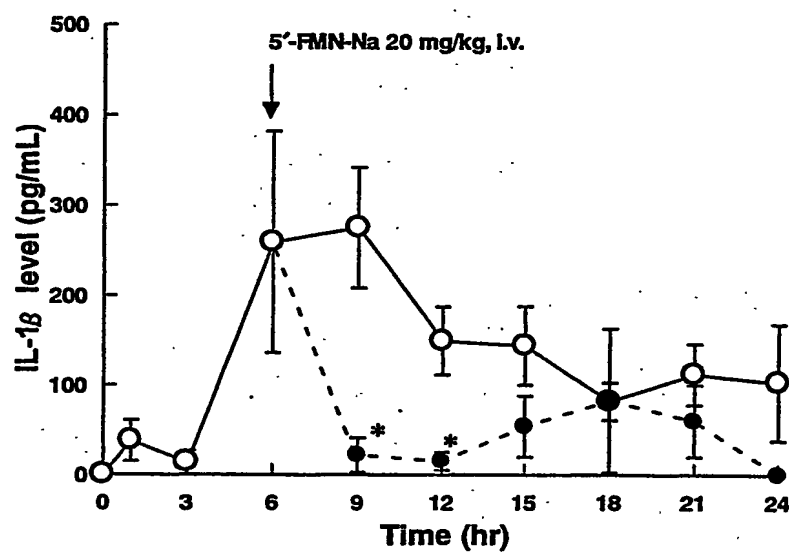
20 13. 高サイトカイン血症の予防剤又は治療剤としての、リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理学的に許容される塩の少なくとも一つの使用。

25 14. リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理学的に許容される塩の少なくとも一つを有効成分とするサイトカイン抑制剤。

15. リボフラビン、リボフラビン誘導体、又はこれらの薬理学的に許容される塩の少なくとも一つを対象物に有効量投与する、高サイトカイン血症の予防又は治療方法。

1 / 15

第1図



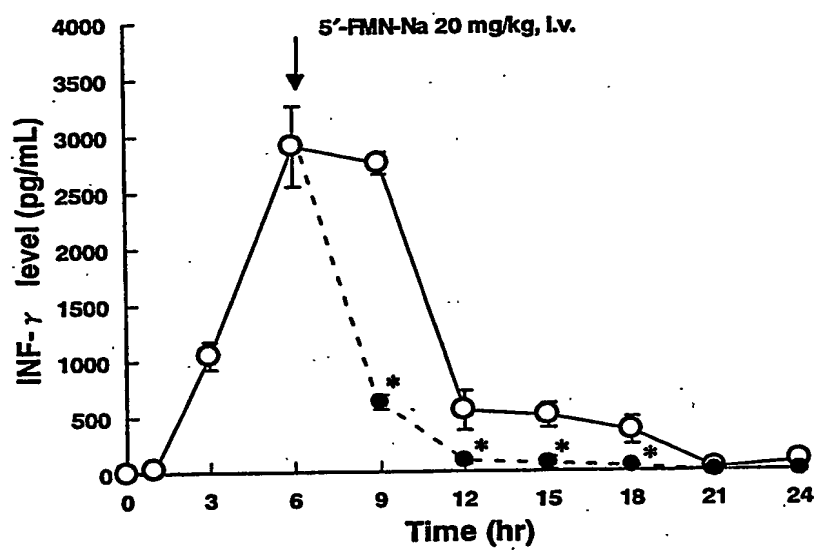
○ : Control group

● : 5'-FMN-Na group

*P < 0.05 vs. Control group (Students t-test)

2 / 15

第2図



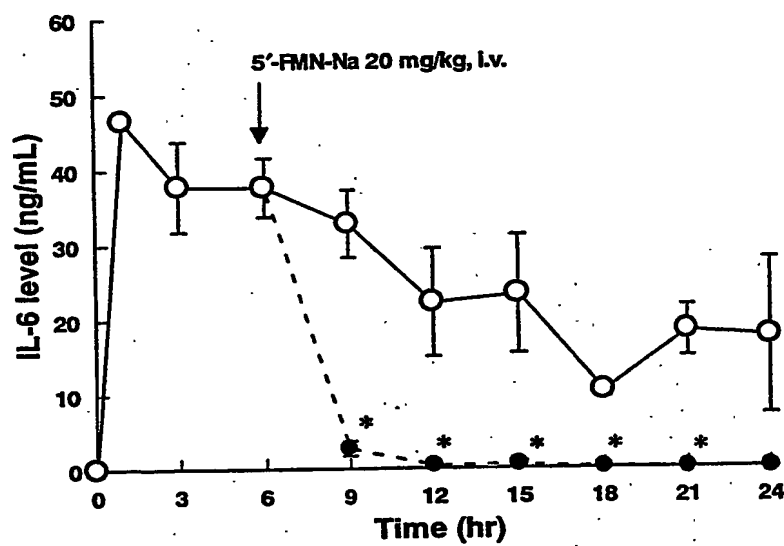
○ : Control group

● : 5'-FMN-Na group

*P < 0.05 vs. Control group (Students t-test)

3 / 15

第3図



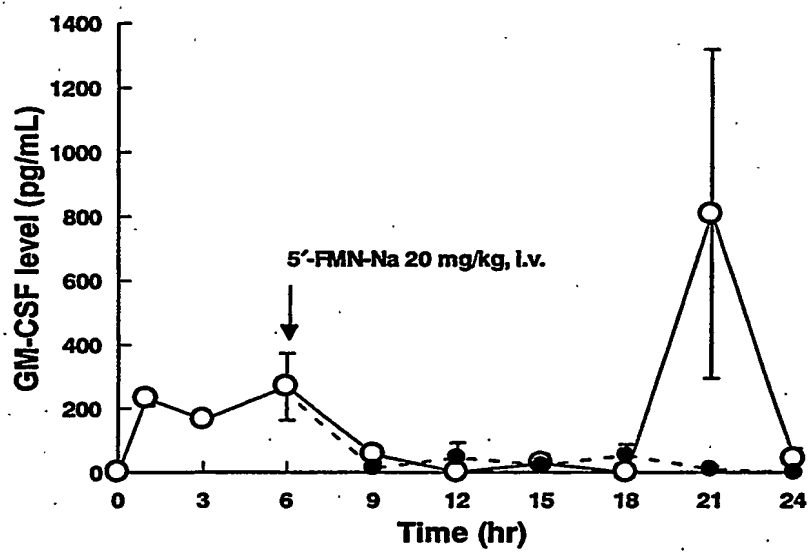
○ : Control group

● : 5'-FMN-Na group

*P < 0.05 vs. Control group (Students t-test)

4 / 15

第4図



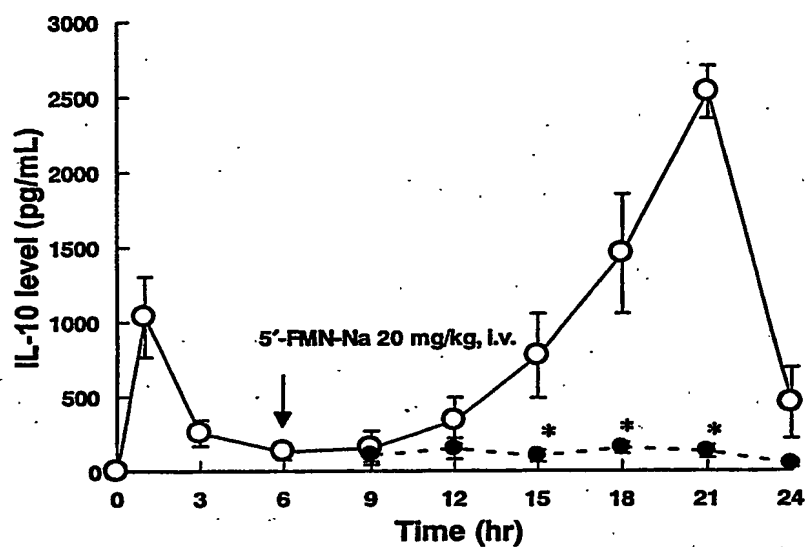
○ : Control group

● : 5'-FMN-Na group

*P < 0.05 vs. Control group (Students t-test)

5 / 15

第5図



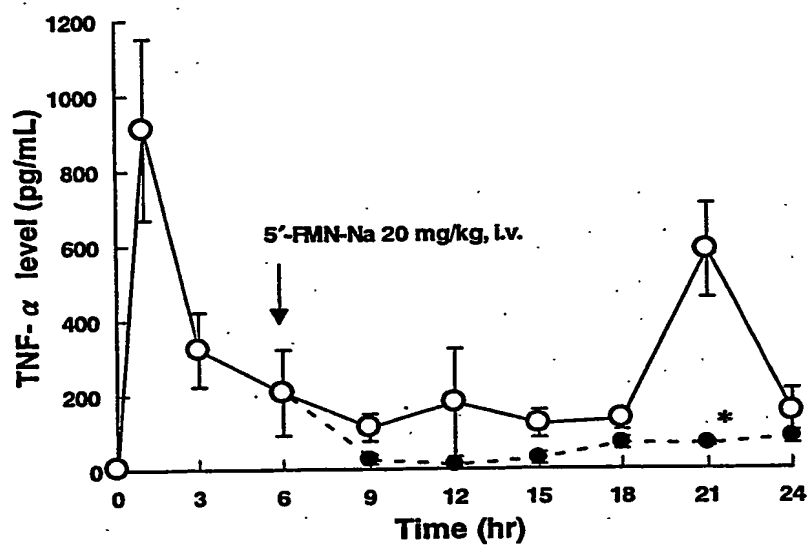
○ : Control group

● : 5'-FMN-Na group

*P<0.05 vs. Control group (Students t-test)

6 / 15

第6図



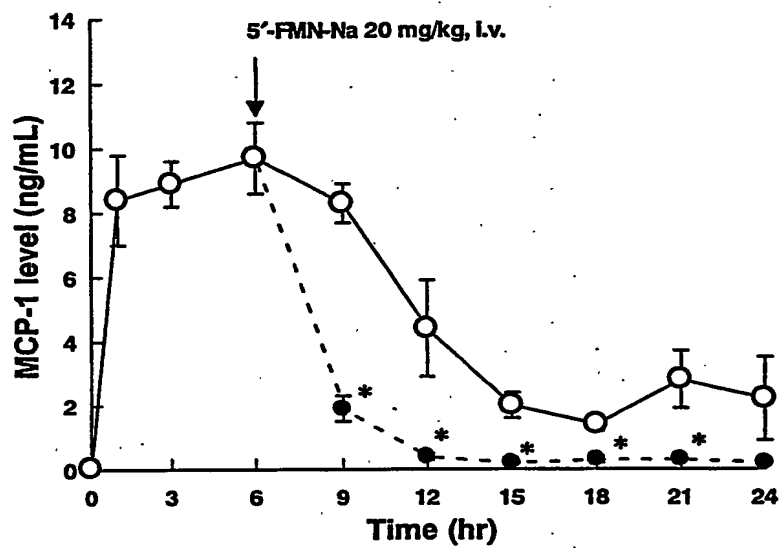
○ : Control group

● : 5'-FMN-Na group

*P < 0.05 vs. Control group (Students t-test)

7 / 15

第7図



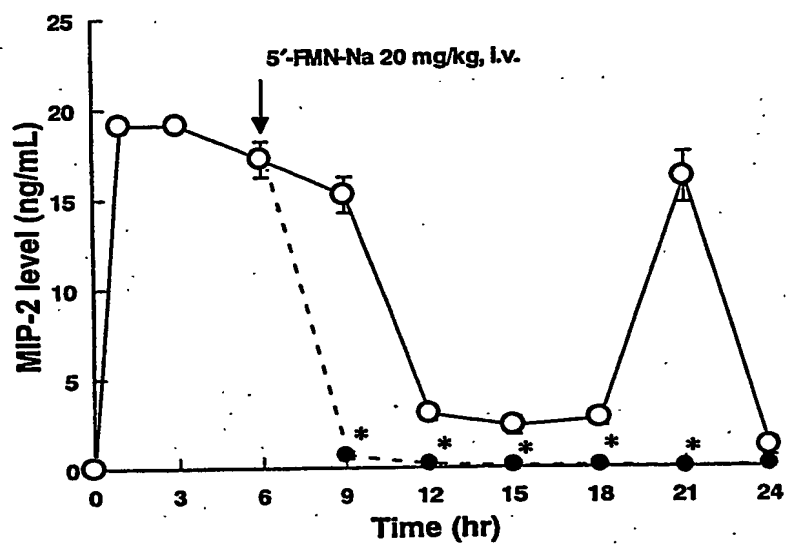
○ : Control group

● : 5'-FMN-Na group

*P < 0.05 vs. Control group (Students t-test)

8 / 15

第8図



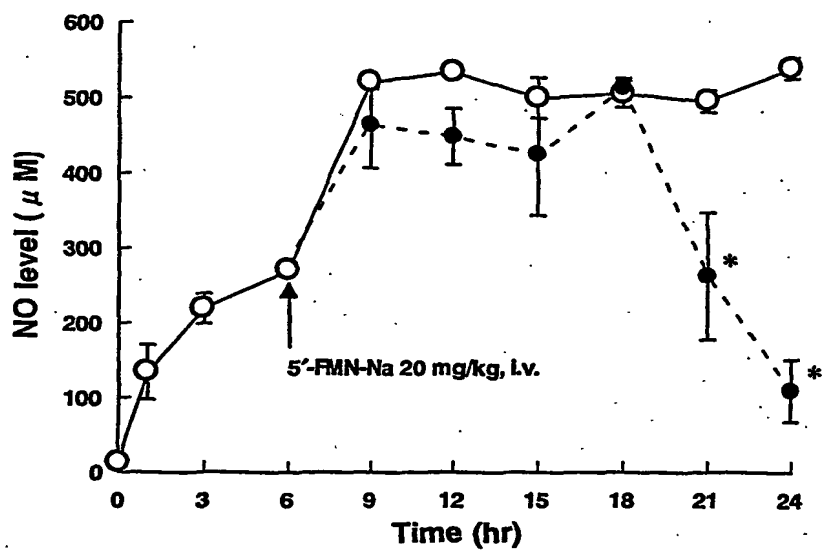
○ : Control group

● : 5'-FMN-Na group

*P < 0.05 vs. Control group (Students t-test)

9 / 15

第9図



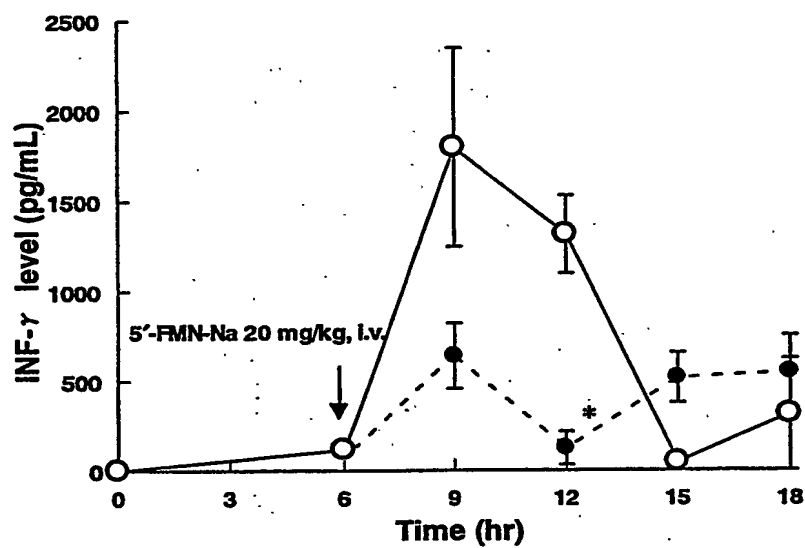
○ : Control group

● : 5'-FMN-Na group

*P < 0.05 vs. Control group (Students t-test)

10/15

第10図



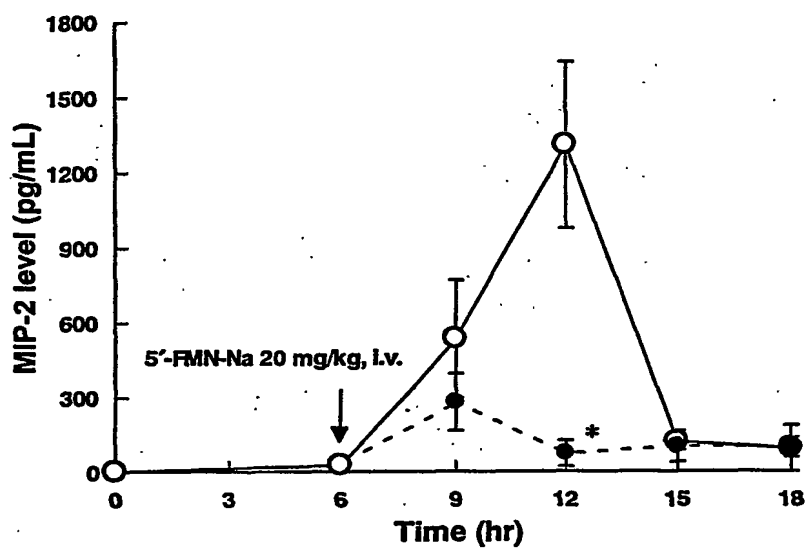
○ : Control group

● : 5'-FMN-Na group

*P < 0.05 vs. Control group (Students t-test)

11/15

第 11 図



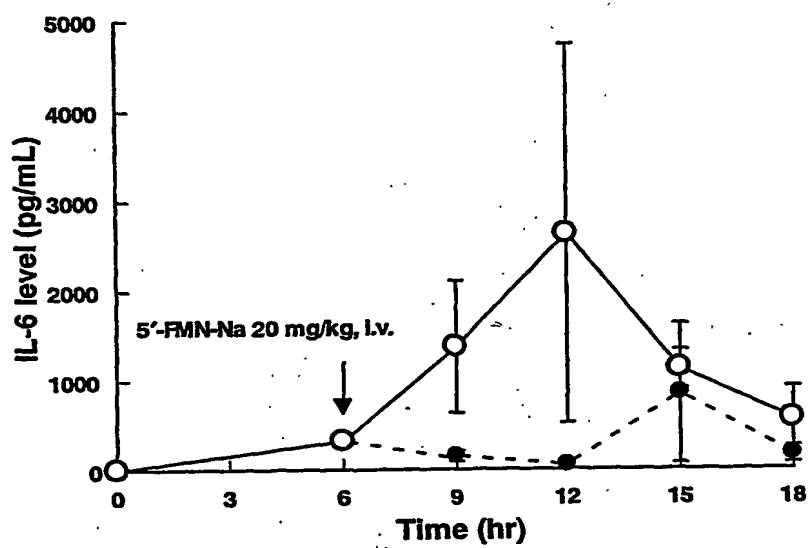
○ : Control group

● : 5'-FMN-Na group

*P < 0.05 vs. Control group (Students t-test)

12/15

第12図



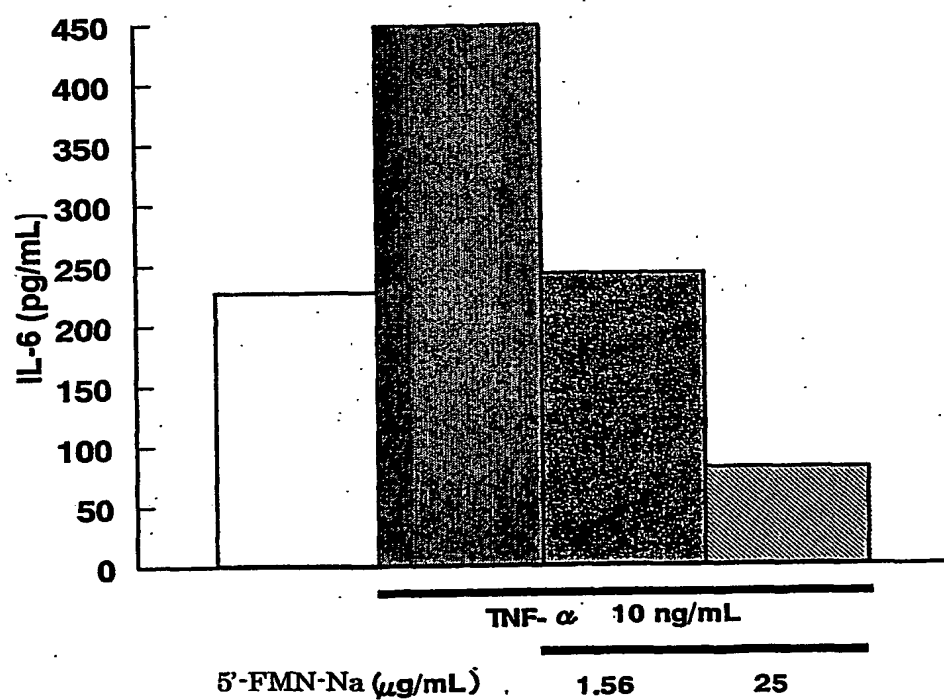
○ : Control group

● : 5'-FMN-Na group

*P < 0.05 vs. Control group (Students t-test)

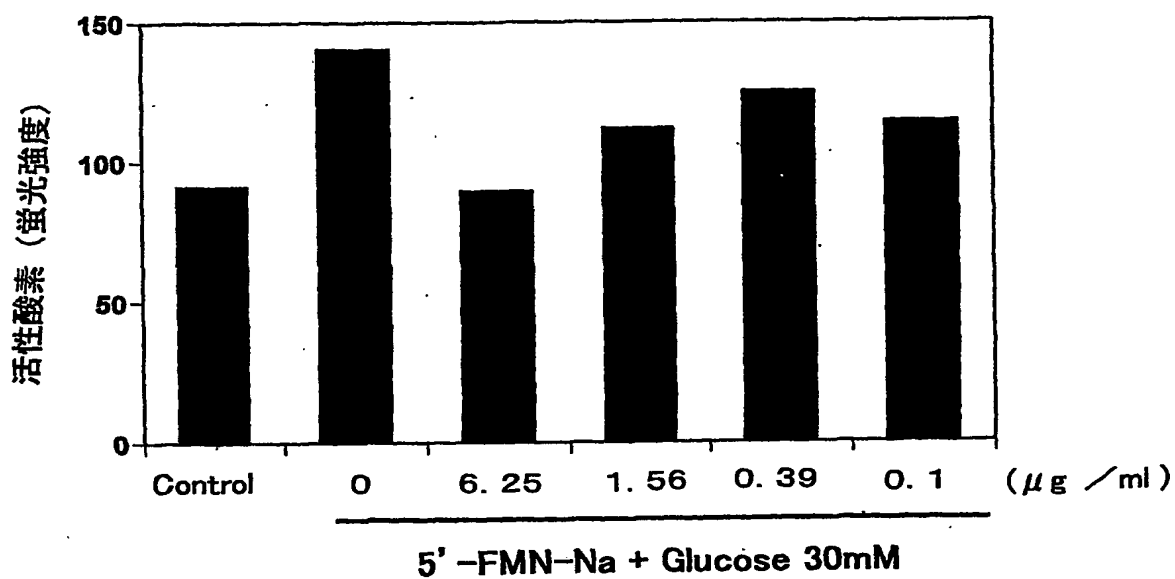
13/15

第13図



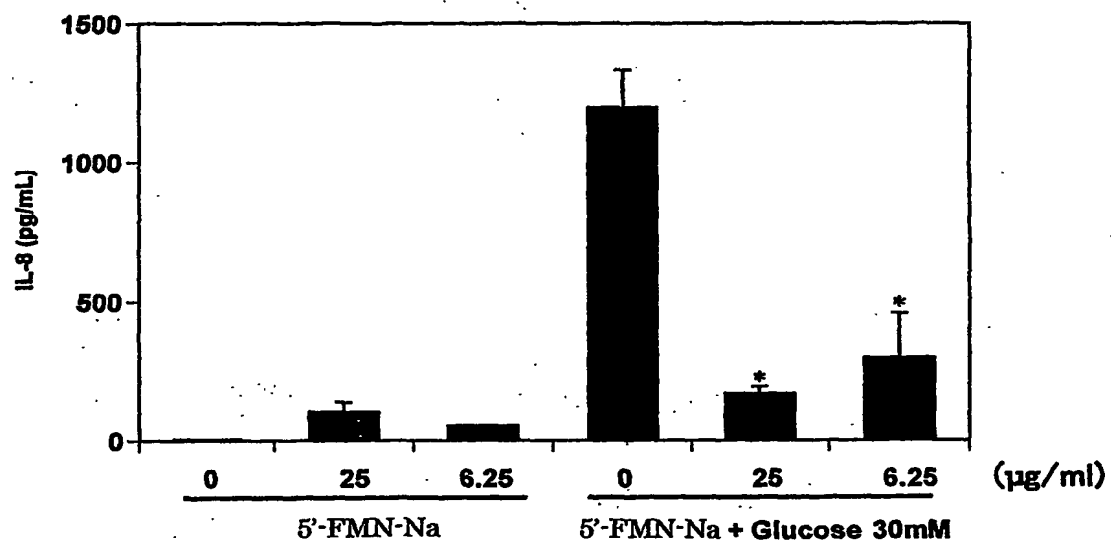
14/15

第14図



15 / 15

第15図



*P < 0.05 vs. Glucose 30mM group (Dunnett 検定)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02868

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/675, 9/10, 9/14, 9/16, 9/20, 9/48, 31/525,
A61P1/16, 1/18, 9/00, 9/10, 17/02, 29/00, 37/00, 43/00//
C07D475/14, C07F9/6561

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K31/675, 9/10, 9/14, 9/16, 9/20, 9/48, 31/525,
A61P1/16, 1/18, 9/00, 9/10, 17/02, 29/00, 37/00, 43/00//
C07D475/14, C07F9/6561

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), WPIL (STN), JOIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|--------------------------|
| X Y | WO 97/36594 A (Eisai Co., Ltd.), 09 October, 1997 (09.10.97), Full description; particularly, page 3, lines 19 to 25 & JP 10-29941 A | 1-2, 6, 9-14 3-5, 7-8 |
| Y | Database MEDLINE on STN, AN 96160719, DN 9616079, PubMed ID 8565523 & Bone R C, Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation., Critical Care Medicine, 1996 January, Vol.24, No.1, pp.163-72 | 3-5, 7-8 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

Date of the actual completion of the international search
06 June, 2003 (06.06.03)

Date of mailing of the international search report
24 June, 2003 (24.06.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02868

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | Database MEDLINE on STN, AN 95047862, DN 95047862, PubMed ID 7959361 & Salgado A, Inflammatory mediators and their influence on haemostasis, Haemostasis, 1994 Mar.-Apr., Vol.24, No.2, pp.132-8 | 3-5, 7-8 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02868

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 15

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 15 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/675, 9/10, 9/14, 9/16, 9/20, 9/48, 31/525, A61P1/16, 1/18, 9/00, 9/10, 17/02, 29/00, 37/00, 43/00 // C07D475/14, C07F9/6561

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/675, 9/10, 9/14, 9/16, 9/20, 9/48, 31/525, A61P1/16, 1/18, 9/00, 9/10, 17/02, 29/00, 37/00, 43/00 // C07D475/14, C07F9/6561

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus(STN), MEDLINE(STN), WPIL(STN), JOIS

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|--------------------------|
| X Y | WO 97/36594 A (エーザイ株式会社), 1997. 10. 09, 明細書全体、特に、第3頁第19-25行 & JP 10-29941 A | 1-2, 6, 9-14 3-5, 7-8 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.06.03

国際調査報告の発送日

24.06.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

榎原 貴子



4C

9444

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き). 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| Y | Database MEDLINE on STN, AN 96160719, DN 9616079, PubMed ID 8565523 & Bone R C, Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation., Critical Care Medicine, 1996 Jan, vol.24, no.1, pp.163-72 | 3-5, 7-8 |
| A | Database MEDLINE on STN, AN 95047862, DN 95047862, PubMed ID 7959361 & Salgado A, Inflammatory mediators and their influence on haemostasis, Haemostasis, 1994 Mar-Apr, vol.24, no.2, pp.132-8 | 3-5, 7-8 |

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 15 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲15は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.